

### 31. Salud Humana

#### **Evaluación de propiedades benéficas de bacterias lácticas aisladas de productos lácteos caprinos**

Bolondi, M. Luján y Márquez, M. Antonela

amarquez@cerela.org.ar, malubolondi@outlook.com

Universidad Nacional de Tucumán

#### **Resumen**

El **objetivo** de este trabajo fue evaluar propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas (BL) aisladas de productos caprinos, con la finalidad de desarrollar una leche fermentada. Se evaluaron 10 cepas de BL aisladas de quesos y leches caprinas identificadas por sus características fenotípicas y mediante técnicas de biología molecular (*Lactobacillus (L.) johnsonii* CRL1231, *L. rhamnosus* CRL1425, *L. plantarum* CRL1427, *L. plantarum* CRL1428, *L. casei* CRL1430, *Lactococcus lactis* CRL1434, *L. fermentum* CRL1446, *L. delbrueckii* subsp. bulgaricus CRL1447, *L. plantarum* CRL 449 y *L. plantarum* CRL 1472). Las propiedades benéficas *in vitro* determinadas fueron: capacidad de adhesión y de autoagregación, propiedades funcionales *in vitro*: Inhibición de la actividad  $\alpha$  – glucosidasa, asimilación de colesterol, actividad feruloil esterasa e hidrolasas de sales biliares. Las pruebas de Seguridad evaluadas: ensayo de translocación bacteriana e inhibición de patógenos. Se determinaron propiedades tecnológica: resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal simuladas, sales biliares y NaCl, tiempo de coagulación de la leche y la compatibilidad entre las cepas. Los **resultados** muestran que las propiedades fueron cepas dependientes, que todas las cepas presentaron compatibilidad e crecimiento entre ellas. Se destaca como cepas con mejores propiedades funcionales: CRL1446, CRL1449, CRL1231. La cepa CRL1447 mostró un perfil adecuado para ser empleado como cultivo iniciador. **Conclusión:** Teniendo en cuenta que los efectos benéficos de los probióticos son cepa dependiente proponemos la administración de un consorcio probiótico a fin de lograr en el huésped efectos positivos a diferentes niveles (regulación del metabolismo lipídico y glucémico del hospedador).

**Palabras clave:** Bacterias Lácticas, Probiótico, Alimentos funcionales.

#### **Introducción**

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos que están presentes en diferentes nichos (vegetales, leche, intestino humano y animal). Estas bacterias se caracterizan por presentar diferentes propiedades beneficiosas las cuales las potencian para ser utilizadas en alimentos fermentados o como probióticos. El término probiótico se define como “microorganismos viables que se administran al hospedador en cantidades adecuadas para producir un efecto benéfico fisiológico” (FAO,2002). Para emplear un microorganismo como probiótico ya sea vehiculizado como un fármaco o como alimento se deben cumplir con diferentes criterios preestablecidos. En general los criterios más relevantes que se deben determinar son: a-Origen e identificación de cepa por métodos fenotípicos y genotípicos e incorporación a una colección de cultivos internacional;

b- Propiedades benéficas in vitro: propiedades de adhesión, autoagregación, inhibición de patógenos, inhibición de absorción de carbohidratos, producción de enzimas (feruloil esterasas, hidrolasas de sales biliares, etc.) absorción de colesterol;

c- Propiedades benéficas in vivo en animales experimentales: ensayos de colonización, ausencia de enfermedades sistémicas, actividades metabólicas perjudiciales, no producción de toxinas, etc.;

d- Caracterización funcional in vitro: Resistencia a acidez gástrica y sales biliares, adherencia a mucosas y a células epiteliales, actividad antimicrobiana, etc. ;

e- Seguridad: Resistencia a antibióticos;

f- Características

tecnológicas: Viabilidad y estabilidad funcional.

### **Objetivos**

El objetivo de este trabajo fue evaluar algunas propiedades probióticas in vitro e in vivo de bacterias lácticas aisladas de productos caprinos, pertenecientes al cepario de CERELA (CRL), con la finalidad de desarrollar una leche fermentada.

### **Materiales y Métodos**

#### *a-Origen e identificación*

Para este estudio se emplearon alrededor de 10 cepas de bacterias lácticas (BL) aisladas de quesos y leches caprinas identificadas por sus características fenotípicas (Abeijon et al., 2006). Las cepas identificadas además mediante técnicas de biología molecular fueron incorporadas a la Colección de Cultivos de CERELA. Las mismas son: *Lactobacillus johnsonii* (CRL 1231), *Lactobacillus rhamnosus* (CRL 1425), *Lactobacillus plantarum* (CRL 1427), *Lactobacillus plantarum* (CRL 1428), *Lactobacillus casei* (CRL 1430), *Lactobacillus lactis* (CRL 1434), *Lactobacillus fermentum* (CRL 1446), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (CRL 1447), *Lactobacillus plantarum* (CRL 1449) y *Lactobacillus plantarum* (CRL 1472).

#### *b- Propiedades benéficas in vitro*

Propiedades de adhesión: se determinó la variación de densidad óptica a 600 nm de suspensiones celulares en solución fisiológica luego de la partición con solventes orgánicos (n-hexadecano, p-xileno o tolueno). Los resultados se expresan como

porcentaje de hidrofobicidad, aplicando la siguiente fórmula: % Hidrofobicidad=  $[(DO_o - DO_f)/DO_o] \times 100$ . Definiendo un porcentaje de hidrofobicidad “alto” aquel que sea mayor a 70%; “medio” entre (30 -70) % y “bajo” menor a 30% (Geertsema et al., 1993).

Propiedades de autoagregación: se centrifugaron las BL y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 1 mL solución fisiológica (SF) estéril y se añadió alícuotas del mismo a un tubo con 3,6 mL de SF estéril. Se resuspendió con agitación hasta alcanzar una DO 600 nm de  $0,60 \pm 0,06$ . Se registró el valor exacto de DO 600 nm inicial ( $DO_o$ ). Se registró las lecturas de DO 600 nm ( $DO_f$ ) a las 2 hs. Los resultados se expresan como porcentaje de autoagregación, aplicando la siguiente fórmula: % Autoagregación=  $[(DO_o - DO_f)/DO_o] \times 100$ , definiendo un porcentaje de hidrofobicidad “alto” aquel que sea mayor a 70%; “medio” entre (30 -70) % y “bajo” menor a 30% (Donaghy et al., 1998).

#### *c-Characterización funcional in vitro*

Inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa: se determinó empleando p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido. La mezcla de reacción contenía 200  $\mu$ L de tampón fosfato (pH 6,5) 0,1 mol /L y 8  $\mu$ L de sustrato de p-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido y 20  $\mu$ L de la muestra. La muestra contenía tres tratamientos: A) 10  $\mu$ L de PBS y 10  $\mu$ L de  $\alpha$ -glucosidasa (0.15 U / mL); B) 10  $\mu$ L de muestra y 10  $\mu$ L de  $\alpha$ -glucosidasa; y C) 10  $\mu$ L de muestra y 10  $\mu$ L de PBS. La reacción se mezcló y se incubó a 37 ° C durante 20 min y se finalizó mediante la adición de 2000  $\mu$ L NaOH

0,1mol/L. La cantidad de p-nitrofenol liberada se cuantificó a 405 nm (Li et al., 2016).

Asimilación colesterol: se inoculó medio MRS caldo adicionado de 230  $\mu$ g/mL de colesterol con las distintas cepas en estudio. Se incubó a 37°C durante 24 hs, transcurrido ese tiempo, se centrifugó y se determinó el colesterol remanente en el medio. El porcentaje de colesterol asimilado se calculó aplicando la siguiente formula: % Colesterol asimilado =  $[(\text{Colesterol inicial} - \text{Colesterol final})/\text{Colesterol inicial}] \times 100$  (Rude y Morris, 1973).

Actividad Ferulolil esterasa: para este ensayo se empleó MRS agar sin glucosa y suplementado con Etil ferulato. El medio fue fundido y se agregó por filtración Etil ferulato, se vertió sobre una placa de Petri y se dejó solidificar. Se efectuaron orificios de 5 mm de diámetro sobre el agar, en los cuales se colocaron 30  $\mu$ L de cada uno de las cepas de interés con el objeto de determinar si las cepas son capaces de hidrolizar el Etil ferulato. Previamente a la siembra en los pocillos, los cultivos se lavan 2 veces con buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7) y se resuspenden en el mismo volumen. Las placas fueron finalmente incubadas a  $37 \pm 0,5$  °C en aerobiosis y se monitoreo las placas cada 24 horas durante 3 días. La actividad FE se evidencio por aparición de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias (Mukdsi et al., 2016).

Hidrolasas de sales biliares: se realizaron spots que contenían 5  $\mu$ L de las suspensiones celulares en SF estéril sobre

el medio de selección de BSH, que constaba de placas de agar MRS suplementadas con sal sódica al 0,5 % (p/v) de ácido taurodesoxicólico y 0,37g/l de CaCl. Las placas se incubaron a 37° C durante 72 hs, después de lo cual la actividad BSH se observó como zona de precipitación en el medio de selección (Dashkevich y Feighner 1989).

#### *d- Seguridad*

Ensayo de translocación bacteriana para determinar la inocuidad de las cepas: se emplearon ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad (n = 12) de la colonia cerrada mantenida en CERELA. Se alojaron en jaulas individuales y se aclimataron a 22 ± 2 ° C con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h. Luego fueron separados en cuatro grupos (n= 3 cada uno) y se alimentaron diariamente durante un período de 7 semanas con un alimento estándar y agua potable ad libitum. Los ratones recibieron por gavaje una dosis de 10<sup>8</sup> UFC/día/ratón de *Lactobacillus johnsonii* (grupo CRL 1231), *Lactobacillus plantarum* (grupo CRL 1427), *Lactobacillus fermentum* (grupo CRL 1446) y el grupo control recibió por gavaje 100 µl de agua. Los animales fueron sacrificados y posteriormente se extrajeron de forma aséptica bazo e hígado; los mismos se colocaron en tubos estériles con 4,5 mL de SF. Los órganos fueron procesados utilizando un disgregador mecánico y se sembró por profundidad 1 mL en placas con medio MRS y MacConkey. Las placas con MRS se incubaron a 37°C durante 48 h y las

placas con MacConkey durante 48 h a 30°C y 45°C. (Moreno et al., 2013).

Inhibición de patógenos por producción de sustancias antagónicas: se realizó por el método de difusión en agar (Parente y col., 1995). En una caja de Petri se agregaron 10 mL de BHI agar blando (0,6%, p/v, agar) fundido, enfriado a 45°C, y previamente inoculado con 10 µL de un cultivo activo de la cepa "indicadora". Una vez solidificada la capa, se efectuaron spots de 5 µL del sobrenadante de un cultivo celular (DO ~ 1,0) del resto de las cepas a estudiar (por separado). Se incubó a 37°C durante 24 h y se evaluó la presencia de zonas de inhibición de desarrollo bacteriano. Se utilizaron *Salmonella*, *Listeria* y *Escherichia coli* como patógenos.

#### *e- Características tecnológicas*

Resistencia a condiciones del TGI simuladas: se evaluó la sobrevivencia de las BL en una solución gástrica simulada (125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO<sub>3</sub> y 3 g pepsina/l, pH 3 y 4) e intestinal simulada (Ox-gall 0.3% (w/v) y pancreatina 0.1% (w/v), pH 8) ((Donaghy et al., 1998).).

Resistencia a sales biliares y NaCl: se evaluó la sobrevivencia de las BL en soluciones de concentraciones creciente de sales biliares Oxgall y NaCl. Se incubó durante 24h a 37°C y se realizó una monitorización del crecimiento mediante determinaciones de DO a 595 nm ( Du Toit et al., 1998)

Tiempo de coagulación: se utilizó leche en polvo comercial como medio de crecimiento preparada al 10% p/v) en tubos de 5 mL, esterilizada a 121 °C por 10 min. Se inoculó

al 2% v/v con las diferentes cepas en estudio (lavadas y sin lavar) y se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Se realizó un monitoreo cada 4 horas para determinar el tiempo necesario de cada cepa para coagular la leche.

Estudio de compatibilidad entre cepas: para este ensayo se empleó MRS agar blando el cual fue fundido y enfriado a 45° antes de ser inoculado con 10 µL de un cultivo activo de la “cepa indicadora. El medio sembrado se vertió sobre una placa de Petri conteniendo una capa de agar duro y se dejó solidificar. Se colocaron 5 µL de cada uno de los sobrenadante del resto de las cepas de interés sobre el agar blando. Las placas fueron incubadas a 37 °C en aerobiosis durante 48 horas. Luego de ese período, se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición del crecimiento en los sitios en los que se había depositado el sobrenadante libre de células. Todos los microorganismos se utilizaron como posibles productores e indicadores.(Parente et al., 1995)

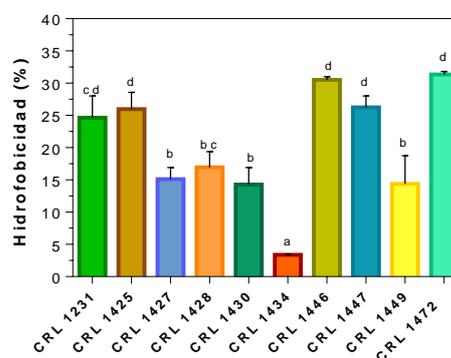
#### f-Análisis estadístico

Los resultados son medias de tres experimentos independientes ± error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron usando el programa InfoStat versión 2017 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) Las diferencias fueron determinadas usando One way ANOVA aplicando test de Fisher. Valores de  $p < 0,05$  fueron consideradas significativamente diferentes.

## Resultados y Discusión

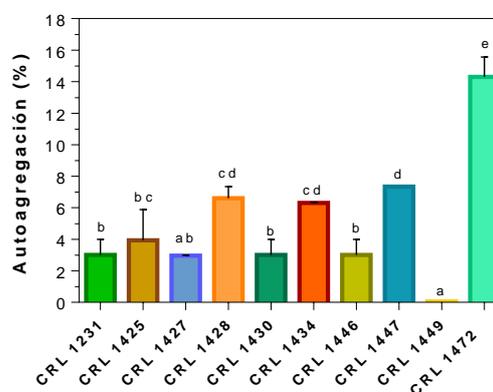
### b- Propiedades benéficas in vitro

Propiedades de adhesión: en la Figura 1 se puede observar que todas las cepas presentaron un porcentaje de hidrofobicidad “bajo”, excepto las cepas CRL 1446 y CRL 1472 con un porcentaje de hidrofobicidad “medio”. Este porcentaje sirve como medida predictiva de su capacidad de adhesión a epitelios.



**Figura 1:** Porcentajes de hidrofobicidad de las distintas cepas bajo estudio. Datos con una letra común no son significativamente diferentes.

Propiedades de autoagregación: se observa en la Figura 2 que todas las cepas presentaron un porcentaje de auto agregación “bajo”, (<30%).



**Figura 2:** Porcentajes de autoagregación de las distintas cepas bajo estudio. Datos con una letra común no son significativamente diferentes.

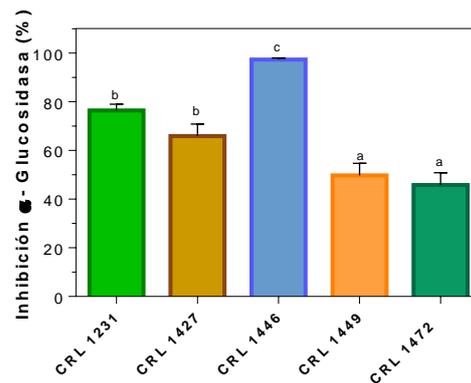
### c- Caracterización funcional *in vitro*

#### Inhibición de la actividad $\alpha$ -glucosidasa

La  $\alpha$ -glucosidasa es una de las enzimas involucradas en la degradación del glucógeno. Su inhibición disminuye la absorción de hidratos de carbono en el intestino reduciendo los niveles de glucosa en sangre luego de una ingesta. Estudios *in vitro* demostraron que algunas cepas de bacterias lácticas tienen la capacidad de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y que en estudios *in vivo* demostraron propiedades hipoglucemiantes, indicando que estas cepas disminuyen la absorción de hidratos de carbono a nivel intestinal.

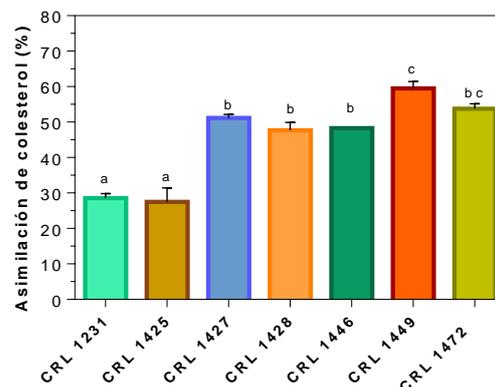
Por lo cual decidimos evaluar si suspensiones celulares de las cepas CRL 1231, CRL 1427, CRL 1446, CRL1449 y CRL1472 presenta capacidad de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, evidenciando su potencial hipoglucemiante.

Los resultados que muestran la Figura 3 indican que las cepas CRL 1231 y CRL 1446 causaron una Inhibición considerable de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa (76 y 97%, respectivamente). La cepa CRL1427 inhibió un 66%, mientras que las cepas CRL 1449 y 1472 inhibieron solamente un 50% la actividad enzimática. Nuestros resultados evidencian que las cepas CRL 1446 y 1231 pueden ser empleadas como cultivos funcionales con propiedades hipoglucemiantes.



**Figura 3:** Porcentajes de inhibición de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa. Datos con una letra común no son significativamente diferentes.

Asimilación colesterol: la Figura 4 muestra el porcentaje de asimilación de colesterol



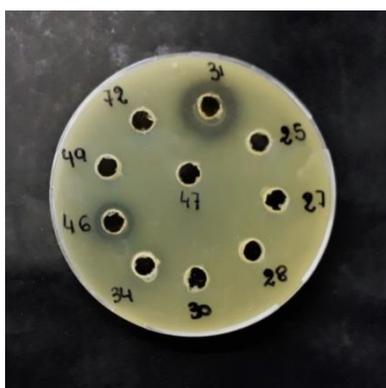
**Figura 4:** Porcentajes de asimilación de colesterol de las distintas cepas bajo estudio. Datos con una letra común no son significativamente diferentes.

Actividad Feruloil esterasa: en la Figura 5 se observa que las cepas CRL 1231 y CRL 1446, fueron las dos únicas que manifestaron actividad feruloil esterasa. Cabe destacar que la cepa CRL 1446 actuó como cepa control positivo.

**Tabla 1:** Actividad de HSB

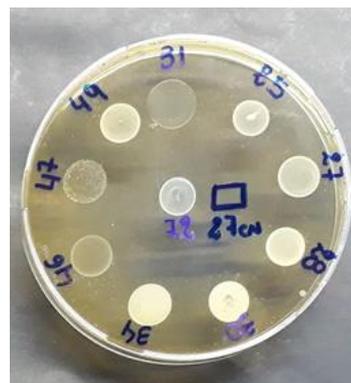
	Determinación cualitativa de la actividad HSB
CRL 1231	+
CRL 1425	++
CRL 1427	+++
CRL 1428	+++
CRL 1430	+++
CRL 1434	+++
CRL 1446	++
CRL 1447	-
CRL 1449	+++
CRL 1472	+++

(+) presencia de actividad; (-) ausencia de actividad



**Figura 5:** Actividad feruloil esterasa detectada en MRS-Etil ferulato. Halos claros alrededor del pocillo indican actividad positiva.

Hidrolasas de sales biliares (HSB): en la Figura 6 se puede observar que todas las cepas poseen actividad BHS, se utilizó como control positivo la cepa CRL 1427 sometida a un shock térmico (10 min a 100°C). En la Tabla 1 se indica de forma cualitativa la actividad HSB que presentó cada cepa.

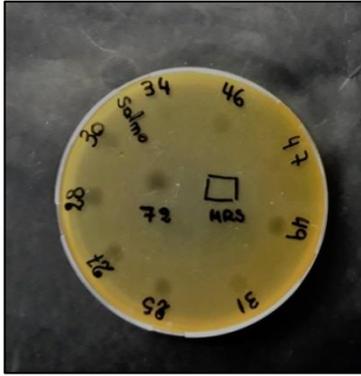


**Figura 6:** Bacterias con actividad HSB. La presencia de actividad se manifiesta por precipitación de las sales biliares en el crecimiento de casa cepas.

#### e- Seguridad

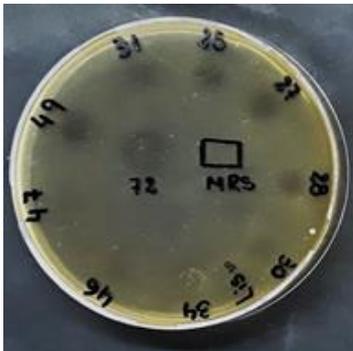
Ensayo de translocación bacteriana para determinar la inocuidad de las cepas: No se observó crecimiento microbiano en las placas sembradas con los sobrenadantes de hígado y bazo, por lo que, se considera que con la dosis utilizada de las cepas CRL 1231, CRL 1427 y CRL 1446 no hubo translocación bacteriana, la cepa evaluada es inocua para los ratones y seguros o aptos para el consumo humano, ya que no favorecieron la colonización de bacterias intestinales a nivel extra intestinal en el modelo in vivo ensayado.

Inhibición de patógenos por producción de sustancias antagónicas: entre las 10 cepas de BL ensayadas, solamente CRL 1434 y CRL 1447 no causaron una inhibición del crecimiento de *Salmonella*, mientras que las restantes tuvieron una respuesta positiva. Se muestran en la Figura 7 los resultados que corresponden al ensayo.



**Figura 7:** Inhibición del crecimiento de *Salmonella* por sobrenadantes de cada bacteria determinado en medio agarizado.

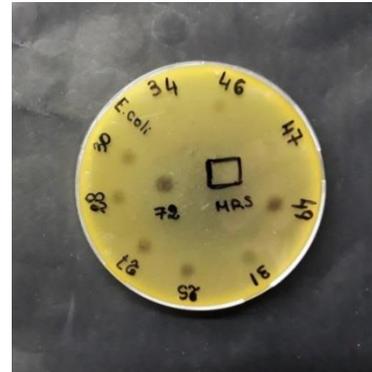
El efecto inhibitorio del crecimiento de *Listeria* causado por las 10 cepas de BL se muestra en la figura X en la que se observa notablemente que las cepas CRL 1431, CRL 1425, CRL 1427, CRL 1428, CRL 1430, CRL 1449 y CRL 1472 tiene un efecto positivo, por lo contrario las cepas CRL 1434, CRL 1446 y CRL 1447 no inhiben el crecimiento de este patógeno.



**Figura 8:** Inhibición del crecimiento de *Listeria* por sobrenadantes de cada bacteria determinado en medio agarizado.

De las 10 cepas en estudio, 8 (CRL 1231, CRL 1425, CRL 1427, CRL 1428, CRL 1430, CRL 1446, CRL 1449 y CRL 1472) causaron una inhibición del crecimiento de *E. coli*, mientras que las restantes tuvieron

una respuesta negativa. Se muestran en la Figura 9 los resultados que corresponden al ensayo.



**Figura 9:** Inhibición del crecimiento de *E. coli* por sobrenadantes de cada bacteria determinado en medio agarizado.

#### f- Características tecnológicas

Resistencia a condiciones del TGI simuladas: se evaluó la sobrevivencia de las cepas en estudio en solución gástrica e intestinal simulada en el laboratorio. Se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 2.

Tabla 2: Resistencia de las bacterias a las condiciones del TGI.

Condiciones	Control (MRS)	Jugo Gástrico (pH3)	Jugo Gástrico (pH4)	Jugo Intestinal (pH8)
UFC/mL				
CRL 1427	$1,0 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^7$
CRL 1428	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^7$
CRL 1434	$7,6 \times 10^8$	$3,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^5$
CRL 1447	$1,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^5$
CRL 1449	$3,0 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$
CRL 1472	$3,0 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$

Se observó tras los recuentos de UFC/ mL en medio agarizado de las cepas CRL 1427, 1428, CRL 1449 y 1472 en ambas soluciones gástricas a pH 3 y pH 4 luego de 2 hs de incubación, con posterior incubación

en la solución intestinal a pH 8 durante 2 hs más, eran resistentes presentando una gran viabilidad. El número de células viables tras estos tratamientos es un indicador de la capacidad de las bacterias de alcanzar el intestino en concentraciones adecuadas para ejercer su efecto probiótico ( $10^6$ - $10^8$  UFC/ml). Las cepas CRL 1434 y CRL 1447 manifestaron una caída de su viabilidad de aproximadamente tres órdenes logarítmicas respecto al control, no pudiendo caer dentro de los parámetros de concentraciones requeridas para ser usadas como probiótico.

Resistencia a sales biliares y NaCl: Para determinar la resistencia de las cepas a sales biliares, se utilizó MRS suplementado de Oxgall y como control positivo se inoculó medio MRS sin la adición de Oxgall. Se pueden observar en la Tabla 3 que el crecimiento de las cepas en el medio con el agregado de Oxgall fue similar al control.

**Tabla 3:** Determinación de UFC/mL de las bacterias en caldo MRS y caldo MRS suplementado con Oxgall 0,3%.

Cepas	MRS	MRS + Oxgall
UFC/mL		
CRL 1231	$1,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
CRL 1425	$6,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$
CRL 1427	$5,3 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
CRL 1428	$1,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
CRL 1434	$2,0 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$
CRL 1446	$2,2 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
CRL 1449	$6,2 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$
CRL 1472	$2,5 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$

Los resultados obtenidos en el estudio de resistencia a sales de NaCl al 4% y 10% p/v se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Resistencia de bacterias a sales de NaCl al 4% y 10 % p/v”.

Cepas	4% NaCl	10% NaCl
CRL 1231	+	-
CRL 1425	+	-
CRL 1427	+	-
CRL 1428	+	-
CRL 1446	++	-
CRL 1449	+++	-
CRL 1472	++	-

(+) indica crecimiento; (-) indica inhibición del crecimiento

Tiempo de coagulación: se realizó un monitoreo cada 4 horas para determinar el tiempo de coagulación. En las Tablas 5 y 6 se puede observar que el tiempo de coagulación en el caso de las cepas lavadas con SF fue mayor a 12 hs para todas las cepas en estudio. Sin embargo cuando se inoculó la leche con las cepas resuspendidas en el medio de cultivo, todas fueron capaces de coagular la leche en un tiempo menor a 12 horas, siendo las cepas CRL 1447 y 1449 las de mayor velocidad de coagulación.

**Tabla 5:** Tiempo de coagulación de cepas lavadas

Cepas	5-8 hs	9-12 hs	>12 hs
Tiempo			
CRL 1231	-	-	+
CRL 1425	-	-	+
CRL 1427	-	-	+
CRL 1428	-	-	+
CRL 1430	-	-	+
CRL 1434	-	-	+
CRL 1446	-	-	+
CRL 1447	-	-	+
CRL 1449	-	-	+
CRL 1472	-	-	+

(+) indica coagulación; (-) indica ausencia de coagulación

**Tabla 6:** Tiempo de coagulación de cepas sin lavar.

Cepas	Tiempo		
	5-8 hs	9-12 hs	>12 hs
CRL 1231	-	-	+
CRL 1425	-	+	+
CRL 1427	-	+	+
CRL 1428	-	+	+
CRL 1430	-	+	+
CRL 1434	-	+	+
CRL 1446	-	+	+
CRL 1447	+	+	+
CRL 1449	+	+	+
CRL 1472	+	+	+

(+) indica coagulación; (-) indica ausencia de coagulación

Estos resultados muestran que la cepa CRL 1447 es la única capaz de coagular la leche en menos de 8 hs, por lo cual puede ser empleada como un cultivo iniciador de la fermentación de la leche, Las otras cepas pueden ser empleadas como cultivos adjuntos o funcionales.

Estudio de compatibilidad entre cepas: En la Tabla 7 se observa los resultados de las distintas combinaciones de cepas sensibles y efectoras. El método de difusión en agar se empleó para evaluar si las 10 cepas de BL producían y secretaban sustancias antagonicas. En todas las combinaciones de cepas y sobrenadantes libres de células, se observó la ausencia de halos de inhibición de crecimiento. Esto indicó que el desarrollo de ninguna de las cepas estudiadas fue inhibido por el sobrenadante de las demás cepas, por lo cual es posible emplear una combinación de estas cepas seleccionadas según diferentes propiedades para la elaboración de un alimento funcional.

**Tabla 7:** Compatibilidad entre cepas

	CRL 1231	CRL 1425	CRL 1427	CRL 1428	CRL 1430	CRL 1434	CRL 1446	CRL 1447	CRL 1449	CRL 1472
CRL 1231		+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRL 1425			+	+	+	+	+	+	+	+
CRL 1427				+	+	+	+	+	+	+
CRL 1428					+	+	+	+	+	+
CRL 1430						+	+	+	+	+
CRL 1434							+	+	+	+
CRL 1446								+	+	+
CRL 1447									+	+
CRL 1449										+
CRL 1472										

(+) indica crecimiento; (-) indica inhibición del crecimiento.

### Conclusiones

Los resultados muestran que las propiedades fueron cepa dependientes, que todas las cepas presentaron compatibilidad e crecimiento entre ellas. Se destaca como cepas con mejores propiedades funcionales: CRL1446, CRL1449, CRL1231. La cepa CRL1447 mostró un perfil adecuado para ser empleado como cultivo iniciador. Teniendo en cuenta que los efectos benéficos de los probióticos son cepa dependiente proponemos la administración de un **consorcio probiótico** a fin de lograr en el huésped efectos positivos a diferentes niveles (regulación del metabolismo lipídico y glucémico del hospedador)

### Bibliografía:

- Abeijón, MC, Medina, RB, Katz, MB, y González, SN (2006). Propiedades tecnológicas de *Enterococcus faecium* aislado de la leche y el queso de oveja con importancia para el desarrollo del sabor. Diario canadiense de microbiología , 52 (3), 237-245.
- Dashkevich, M.P., and S.D. Feighner. 1989. Development of a differential medium for bile-salt hydrolase-activity

*Lactobacillus spp.* Applied and Environmental Microbiology.55:11– 16.

- Donaghy J., Nelly P.F., McKay A.M. (1998) Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus spp.* and *Lactobacilli*. Journal of Applied Microbiology. Biotechnology. 50: 257-260.
- Du Toit, M., Franz, C., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B. et al. (1998). Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary mini pig feeding trail and their effect on serum cholesterol level, faeces pH and faeces moisture content. International Journal of Food Microbiology. 40, 1–2, 93–104.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report .) <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgrepo rt2.pdf>.
- Geertsema GI, Van Der Mei HC, Busscher HJ. (1993). Microbial cell surface hydrophobicity. The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). Journal of Microbiological Methods. 18:61-68.
- Moreno, R; Salas, E.; Perez Maldonado, C.; Jimenez, J. (2013) Inocuidad de lactobacilos potencialmente probióticos aislados de heces de lactante y leche materna. Acta bioclinica. 5(3) 149-157.
- Mukdsi MC, Argañaraz Martínez E, Chaia AP, Medina RB. (2016). Feruloyl esterase activity is influenced by bile, probiotic intestinal adhesion and milk fat. Beneficial Microbes. Sep;7(4):597-607. doi: 10.3920/BM2015.0197.
- Parente, A., Brienza, C., Moles, M., Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. J. Microbiol. Meth., 22, 95-108.
- Rude I, L.L. and Morris, M.D. (1973). Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. Journal of Lipid Research 14: 364-366.
- X. Li, N. Wang, B. Yin, D. Fang, J. Zhao, H. Zhang, G. Wang and W. Chen. (2016). *Lactobacillus plantarum* X1 with  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Activity Ameliorates Type 2 Diabetes in Mice. RSC Advances 6 (68), 63536–63547.

**Financiamiento:** PIUNT A619, PIP215.